# Bestimmung der Aktivitäten von Galaktose–1–Phosphat–Uridyl––Transferase, AMP–5'Nucleotidase, Myokinase und Adenosintriphosphat spaltendem Enzym in Inkubationslösungen von Hirnschnitten des Kaninchens

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

**Hans-Joachim Gebicke**

Saarbrücken

1973

Aus der Neurochirurgischen Klinik der Universität
des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. F. Loew

---

# Bestimmung der Aktivitäten von Galaktose-1-Phosphat-Uridyl--Transferase, AMP-5'-Nucleotidase, Myokinase und Adenosin - triphosphat spaltendem Enzym in Inkubationslösungen von Hirnschnitten des Kaninchens.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973

vorgelegt von
Hans-Joachim Gebicke
geb. am 26.2.1946 in Neustadt/Weinstraße

Dekan : Professor Dr. med. G. A. Jutzler
Referent: Professor Dr. med. F. Loew

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mündliche Prüfung abgelegt am 14. Dezember 1973

Bestimmung der Aktivitäten von Galaktose-1-Phosphat-Uridyl--Transferase, AMP-5'-Nucleotidase, Myokinase und Adenosintriphosphat spaltendem Enzym in Inkubationslösungen von Hirnschnitten des Kaninchens.

1. Einleitung.

2. Darstellung der eigenen Befunde.

2.1. Material.

2.2. Gewinnung der Inkubationslösungen.

2.3. Allgemeines zur analytischen Methodik.

2.3.1. Optischer Test.

2.3.2. Phosphatbestimmungen.

2.4. Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase-Aktivität.

2.4.1. Methodik.

2.4.2. Ergebnisse.

2.5. AMP-5'-Nucleotidase-Aktivität.

2.5.1. Methodik.

2.5.2. Ergebnisse.

2.6. Myokinase-Aktivität.

2.6.1. Methodik.

2.6.2. Ergebnisse.

2.7. Adenosintriphosphatase-Aktivität?

3. Diskussion der Ergebnisse.

3.1. Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase.

3.2. AMP-5'-Nucleotidase.

3.3. Myokinase (Konsequenz für spätere WARBURG-Versuche).

3.4. Adenosintriphosphat spaltendes Enzym (Diskussion der Ergebnisse, neue Fragestellung für spätere Untersuchungen, Konsequenz für spätere WARBURG--Versuche).

4. Zusammenfassung.

5. Schrifttumsverzeichnis.

6. Verzeichnis der Abkürzungen.

1. Einleitung.

Beim Schneiden von Geweben werden zwangsläufig viele Zellen verletzt. Diese Zellen werden dann bei in vitro--Inkubationen ihre löslichen Bestandteile verlieren und an die umgebende Lösung abgeben. Lösliche Substanzen können außerdem auch durch reine Diffusion aus intakten Zellen in die Lösung übergehen.

AEBI (1) hat solche Vorgänge bereits 1952 beobachtet. Er zeigte, daß in der Versuchsanordnung nach WARBURG (16) zwischen der Schädigung von inkubierten Leberschnitten und dem Übertritt von stickstoffhaltigen Substanzen in das Inkubationsmilieu eine Parallele besteht. Abhängig von der Zusammensetzung der Inkubationslösung wird dieser Übertritt durch eine Quellung der Schnitte beschleunigt.

Nach AEBI (1) ist es möglich, in Leberschnitten durch optimale Zusammensetzung der Inkubationsflüssigkeit sowohl Quellung, als auch den Verlust stickstoffhaltiger Substanzen weitestgehend zu verhindern; AEBI (1) folgert aus seinen Untersuchungen, daß die Stickstoffabgabe als Test für die Schädigung des Gewebes im WARBURG-Versuch gewertet werden kann.

In einer Übersichtsarbeit hat QUASTEL (11) 1957 bereits konkrete Ergebnisse über die Art der aus Schnitten freigesetzten Substanzen und über die Konsequenzen für Stoffwechselmessungen in vitro beschrieben:

Es können sowohl Koenzyme als auch Enzyme selbst aus den Schnitten in das umgebende Medium übergehen.

In dieser Lösung können dann auch Reaktionen ablaufen.

Hydrolytische Enzyme können dort beispielsweise ATP, NAD oder ähnliche Substanzen zersetzen, die innerhalb der intakten Zellen wegen stuktureller Schranken derartige Abbaureaktionen nicht durchlaufen können. (Eine praktische Konsequenz dieser Reaktionen besteht darin, bei bestimmten in vitro-Versuchen Nicotinamid in hohen Konzentrationen zuzusetzen und dadurch die NAD-ase in der Lösung zu hemmen.
In solchen Systemen kann sogar Hirnextrakt aus Glucose oder Fruktose große Mengen von Milchsäure bilden).
Im Labor der Homburger Neurochirurgie läuft ein Versuchsprogramm über den Stoffwechsel von Schnitten aus normalem und durch Kälteeinwirkung ödematös verändertem Kaninchenhirn. Innerhalb dieses Programms werden hauptsächlich folgende drei Fragestellungen untersucht:

1. Wie ist der Stoffwechsel durch Veränderung der Inkubationsbedingungen ($O_2$-, $CO_2$-, Glucose- Konzentrationen) zu beeinflussen?
2. Gibt es einen Unterschied in der Stärke des Glucosestoffwechsels von normalem und ödematösem Kaninchenhirn?
3. Können Stoffwechsel und Quellung der Schnitte durch Zugabe bestimmter Substanzen verändert werden?

Das erste wichtige Ergebnis dieser Arbeiten war der Nachweis eines gesteigerten Glucosestoffwechsels, insbesondere der Glykolyse, im Hirnödem. (HERRMANN und DITTMANN)(4,5,6,8).
Mit diesem Nachweis tauchte aber sofort die Frage auf, ob die gemessenen Vorgänge tatsächlich innerhalb der Schnitte, oder außen in der Lösung ablaufen. TRAUTMANN (14) hat neun der insgesamt elf Enzyme aus der Glykolysekette nachgewiesen,

wegen des Fehlens von Hexokinase und Fruktose-6-Phosphat--Kinase kann jedoch in der Lösung keine Glykolyse ablaufen. In noch laufenden Untersuchungen wird geprüft, ob Schnitte aus ödematösem Gehirn stärkere Enzymaktivitäten abgeben als vor dem Versuch nicht gequollene Schnitte.
Es wurden im Lauf der Untersuchungen auch einige Substanzen gefunden, die durch Wirkungen auf die Membranen oder auf den Stoffwechsel die Quellung der Schnitte in vitro verringern (DITTMANN)(4,5,6).
Auch aus diesen Beobachtungen ergibt sich eine wesentliche Frage nach dem Auftreten löslicher Enzyme in den Inkubationslösungen. Hydrolytische Enzyme beispielsweise, können Phosphatester spalten, und es besteht dann die Frage, ob die zugesetzten Substanzen überhaupt unverändert von den Zellen aufgenommen werden, oder ob sie nach Abbau in der Lösung schwächere, qualitativ veränderte, oder sogar stärkere Wirkungen auf die Quellung der Schnitte ausüben.
Ein letzter Gesichtspunkt für die hier zu beschreibenden Versuche, die im Rahmen der anderen gelaufenen und noch laufenden Arbeiten betrachtet werden sollten, ist die Frage nach Möglichkeiten zur Erweiterung von Liquordiagnostik.
In sehr grober Näherung kann vielleicht der Übertritt von Enzymen aus inkubierten Hirnschnitten in die umgebende Lösung mit dem Austausch von Enzymen aus Hirngewebe in situ in den Liquor verglichen werden. Es soll hier keinesfalls behauptet werden, daß in Inkubationslösungen nachweisbare Enzyme aus dem Gehirn auch im Liquor auftreten müssen; umgekehrt schließt aber wohl das Nichtauftreten in unseren Proben jede Nachweis-

barkeit im Liquor von Patienten mit erworbenen pathologischen Veränderungen des Gehirns völlig aus.
Aus der Beschreibung der Erkenntnisse aus unserem Labor ergeben sich folgende Fragestellungen der vorliegenden Arbeit:

1. Ist in den beschriebenen Inkubationslösungen GAL-1-PUT nachweisbar?
2. Ist AMP-5'-Nucleotidase-Aktivität vorhanden?
3. Ist MK in den gleichen Lösungen nachweisbar?
4. Ist ATP-ase nachweisbar?

## 2. Darstellung der eigenen Befunde.

### 2.1. Material.

Es wurden ausgewachsene Kaninchen ohne Berücksichtigung von Rasse und Geschlecht verwendet. Die Gewichte lagen zwischen 2 und 3 kg.
Nach Töten durch Luftembolie wurden die Gehirne herausgenommen und sofort in eine eisgekühlte Lösung gegeben, die abgekürzt "K-Lösung" genannt wird und folgende Zusammensetzung hat:

| | | | |
|---|---|---|---|
| $Na^+$ | 133,4 mM | $HCO_3^-$ | 25,0 mM |
| $K^+$ | 5,0 mM | $HPO_4^{--}$ | 1,2 mM |
| $Ca^{++}$ | 2,5 mM | $H_2PO_4^-$ | 0,3 mM |
| $Mg^{++}$ | 0,8 mM | $SO_4^{--}$ | 0,8 mM |
| $Cl^-$ | 115,7 mM | D-Glucose | 5,0 mM |

## 2.2. Gewinnung der Inkubationslösung.

Von beiden Hemisphären wurde ein ca. 5 mm breiter Streifen, beginnend an der fissura longitudinalis cerebri, in lateraler Richtung medullawärts entnommen. Der Streifen liegt unmittelbar occipital an die nekrotische Stelle angrenzend, die bei der Kälteeinwirkung (Erzeugung von Kälteödemen, siehe HERRMANN und DITTMANN, 1970)(8) entsteht.

Die Streifen haben nach möglichst vollständigem Abpräparieren von weißer Substanz und Arachnoidea mit Gefäßen ein Frischgewicht von ca. 400 - 700 mg.

Aus beiden Kortexstreifen wurden in einer eisgekühlten Petrischale mit dem Skalpell Schnitte von ca. 0,5 - 1 mm Kantenlänge und maximal 0,3 mm Dicke hergestellt.

Nach mehrmaligem Waschen durch Aufwirbeln und Dekantieren in frischer kalter K-Lösung wurden die Schnitte mit Pinzetten möglichst gleichmäßig in vier vorbereitete Reaktionsgefäße verteilt. Es wurden Kegelgefäße mit großem Anhänger und Birne der Fa. BRAUN Apparatebau Melsungen, Best.Nr. 73305, verwendet.

Die Inkubationen erfolgten nach der neuen manometrischen Zweigefäßmethode (WARBURG, 1967)(16) unter Gasgemischen mit wechselnden Anteilen von Sauerstoff und Kohlendioxyd bei 38°C.

Dabei wurden die Reaktionsgefäße folgendermaßen beschickt:

Gefäß I

Hauptraum: 2,7 ml K-Lösung

Anhänger : 3,0 ml Wasser

Birne : 0,3 ml K-Lösung, evtl. mit Wirkstoff

Gefäß II

Hauptraum: 2,7 ml K-Lösung

Anhänger : 2,9 ml $KHCO_3$-$K_2CO_3$-Puffer + 0,1 ml Wasser mit 2 mg Karboanhydrase

Birne : 0,3 ml K-Lösung, evtl. mit Wirkstoff

Nach einer Inkubationsdauer von 3 Std. wurden die Gefäße aus dem Thermostaten genommen, und die Suspensionen der Schnitte wurden mit gekrümmten Glasröhrchen und Gummisaugern in Zentrifugengläser überführt. Nach 10minütigem Zentrifugieren bei 3000·g wurden die überstehenden klaren Lösungen abgegossen und sofort in eine Kühltruhe von -40°C gebracht, wo sie bis zur Untersuchung in verstöpselten Glasröhrchen gelagert wurden.

Die inneren Wandungen der Zentrifugengläser wurden mit Tupfern möglichst vollständig von anhaftender K-Lösung befreit. Durch Wägen, ca. 18stündiges Trocknen bei 105°C und wiederholtes Wägen, wurden Frisch- und Trockengewichte der Schnitte bestimmt.

2.3. Allgemeines zur analytischen Methodik.

2.3.1. Optischer Test.

Unter dem "Optischen Test" nach WARBURG (15) versteht man eine analytische Methode, die folgendes berücksichtigt:

Die reduzierten Formen des Nicotinamid-adenin-di- und trinucleotids (NADH und NADPH) absorbieren im UV mit einem Maximum bei 340 nm und einem zweiten schwächeren Maximum bei 366 nm.

Die oxydierten Formen (NAD und NADP) absorbieren dagegen bei

diesen Wellenlängen praktisch nicht. Wenn also bei einer Reaktion NADH bzw. NADPH gebildet oder verbraucht werden, kann man die Absorption im UV messen und unter Anwendung des LAMBERT-BEERschen Gesetzes aus den gemessenen Extinktionsänderungen die Menge der umgesetzten Substanz berechnen.
Bei Reaktionen, die keinen Umsatz von Wasserstoff haben, Veresterungen und Verseifungen z.B., kann man den sogenannten "zusammengesetzten optischen Test" anwenden, hierbei reagiert eines der Reaktionsprodukte in einer oder mehreren weiteren Reaktionen so, daß dabei reduzierte Nicotinamid-adenin-nucleotide entstehen, oder verbraucht werden. Für diese Hilfsreaktionen setzt man reine Hilfsenzyme in hoher Aktivität zu. Die methodischen Einzelheiten, die dabei berücksichtigt werden müssen, hat BERGMEYER (2) ausführlich beschrieben.
Die Messungen wurden in einem Fotometer EPPENDORF in Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke in einem auf 25°C temperierten Halter durchgeführt. Die Wellenlänge betrug 334 nm; gemessen wurde unter Benutzung der Fotozelle 90 b ohne Benutzung eines Schreibers. Alle Extinktionen wurden in Abständen von jeweils 1 min abgelesen.
Die Auswertung der Ablesungen erfolgte in Anlehnung an die von BERGMEYER (2) gegebene Formel

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot 3 \cdot 10^9}{\varepsilon \cdot t \cdot v \cdot a} \quad \left[\text{mU pro mg Trs.}\right] \quad \text{oder}$$

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot 10^9}{\varepsilon \cdot t \cdot v} \quad \left[\text{mU pro ml Probe}\right]$$

Hierbei bedeuten: $\Delta E$ = gemessene Extinktionsänderung

$V$ = Gesamtvolumen in der Küvette

$\varepsilon$ = Extinktionskoeffizient des (NADH bei 334 nm $6 \cdot 10^6$)

$t$ = Zeit, in der $\Delta E$ ermittelt wurde, in min

$v$ = Volumen der Probe im Reaktionsansatz

$a$ = mg Trockensubstanz pro Warburggefäß

Die Ergebnisse werden hierbei in "mU" = Millieinheiten erhalten. Unter einer Einheit versteht man diejenige Enzymaktivität, die pro Minute ein µMol Substrat umsetzt. Grundsätzliche Bedingung ist hierbei jedoch, daß unter optimalen Bedingungen gemessen wird. Ich habe das berücksichtigt, indem ich für MK und GAL-1-PUT die Vorschriften verwendet habe, nach denen BOEHRINGER (3), Mannheim die Aktivitäten reiner Enzympräparate mißt.

Ich habe nur drei Änderungen gegenüber den Originalvorschriften eingeführt:

1. Wurde wegen der geringeren Aktivität etwas mehr Probe eingesetzt.
2. Wurden einige Reagenzlösungen in geringerer Menge, aber entsprechend erhöhter Konzentration eingesetzt, um die gleichen Endkonzentrationen zu erhalten.
3. Wurden einige Substanzen in einer Lösung zusammengefaßt, um Pipettierarbeit zu sparen.

2.3.2. Phosphatbestimmungen.

Die Phosphatbestimmungen wurden nach der von GERLACH und HIBY (7) bei der Vorschrift zur Messung der 5'-Nucleotidase-

-Aktivität angegebenen Methodik bestimmt.
Hierbei wird anorganisches Phosphat mit Ammoniummolybdat in saurer Lösung zu Phosphomolybdänsäure umgesetzt, das man in acetatgepufferter Lösung mit p-Aminophenol zu Molybdänblau reduziert wird.
Alle Phosphatbestimmungen wurden im Fotometer EPPENDORF in Küvetten mit 2 cm Schichtdicke bei der Wellenlänge 578 nm unter Benutzung der Fotozelle 90 s abgelesen.
Die Arbeitsvorschrift wurde zur Vereinfachung lediglich in folgenden drei Punkten geändert:

a. Molybdatlösung und Wasser wurden vor der Benutzung im Verhältnis 2:7,5 gemischt, und es wurden 9,5 ml in jeden Ansatz gegeben.
b. Acetatlösung und Wasser wurden vor der Benutzung im Verhältnis 4:3 gemischt, und es wurden 4,0 ml in jeden Ansatz gegeben.
c. Um mehrere Proben in einer Versuchsreihe messen zu können, wurde zwischen Einpipettieren der Acetatlösung und Ablesen der Extinktionen jeweils genau 10 min stehengelassen.

2.4. Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase-Aktivität.

2.4.1. Methodik.

Test-Prinzip:

$$\text{Galaktose-1-P} + \text{UDPG} \xrightarrow{\text{GAL-1-PUT}} \text{UDP-Galaktose} + \text{G-1-P}$$

$$\text{G-1-P} \xrightleftharpoons{\text{PGluM}} \text{G-6-P}$$

$$\text{G-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{Gluconat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Bei dieser Reaktionsfolge wird das zunächst aus Uridyldiphosphatglucose in der GAL-1-PUT-Reaktion gebildete Glucose-1-Phos-

phat isomerisiert.

In einer zweiten Hilfsreaktion wird dann Glucose-6-Phosphat mit NADP und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bestimmt.

Das komplette Testgemisch wurde zunächst mit Probe, jedoch ohne UDPG solange inkubiert, bis sich die Extinktion in einer Minute um maximal 0,002 Skaleneinheiten erhöhte.

Anschließend wurde durch Zusatz von UDPG gestartet. Die Extinktionsänderung wurde dann während 6 min verfolgt.

| | Reagenzlösung | | Reaktionsgemisch | |
|---|---|---|---|---|
| Substanz | Konzentration mg/ml | Molarität mM | Testlösung ml | Endmolarität mM |
| Glycinpuffer[1)] | 9,4 | 125,5 | 2,04 | 85,30 |
| NADP, Na-Salz | 10 | 11,4 | 0,10 | 0,40 |
| Galaktose-1-P, K-Salz | 40 | 89,1 | 0,15 | 4,50 |
| G-1,6-$P_2$, CHA-Salz | 2 | 2,4 | 0,03 | 0,02 |
| PGluM | 10 | | 0,06 | |
| G-6-PDH Reinheitsgr.I | 5 | | 0,02 | |
| Probe | | | 0,50 | |
| UDPG | 10 | 14,7 | 0,10 | 0,50 |

[1)] Durch Zusatz von NaOH auf pH 8,7 gebracht.

In der Originalvorschrift von BOEHRINGER (3) ist für den Puffer ein pH-Wert von 8,0 angegeben. Es wurde aber nicht bei pH 8,0, sondern pH 8,7 gearbeitet.

Begründung: Ein pH von 8,0 läßt sich mit Glycin-NaOH kaum einstellen, und außerdem wird in einer GAL-1-PUT-Vorschrift der

Fa. SIGMA für klinisch-chemische Tests ein pH von 8,7 angegeben.

2.4.2.

Eine Vorbemerkung zur Darstellung der Ergebnisse:
Jeder manometrische Serienversuch bestand aus acht Reaktionsgefäßen, davon vier mit Schnitten aus der Kontrollhemisphäre und vier mit Schnitten aus der ödematösen Hemisphäre. Zur Hälfte der jeweils vier Gefäße wurde im Laufe der Inkubation eine Substanz zugesetzt, um zu prüfen, ob sie den Stoffwechsel oder die Wassereinlagerung in die Schnitte beeinflußt. Entsprechend dem Schema ungeschädigte Hemisphäre - ödematöse Hemisphäre und Kontrolle - Substanzzusatz sind in den folgenden Tabellen die Ergebnisse für die vier Arten von Proben gesondert angegeben.

Versuch A 12

| | Kontrolle |
|---|---|
| ungeschädigte Hemisphäre | 0,1 ± 0,01 mU/mg Tr. |
| ödematöse Hemisphäre | 0,1 ± 0,11 mU/mg Tr. |

Versuch TR 2

| | |
|---|---|
| Kontrolle | 0,245 ± 0,005 mU/mg Tr. |
| Dexascheroson 25 µg/ml | 0,21 ± 0,01 mU/mg Tr. |
| Dexascheroson 2,5 µg/ml | 0,19 ± 0,03 mU/mg Tr. |

Aus den vorstehenden Tabellen ist ersichtlich, daß die unter-

suchten Proben praktisch keine GAL-1-PUT-Aktivität hatten. Auch ergab sich (Versuch TR 2) keine in Relation zur Konzentration des Dexascheroson stehende Beeinflussung der gemessenen Aktivität der Kontrollsubstanz.
Reines Enzym ist bei BOEHRINGER nicht mehr erhältlich. Mit einem definierten GAL-1-PUT-Präparat konnte also nicht geprüft werden, ob der Test funktionierte. Aus einer Kinderklinik wurden jedoch zufällig zur selben Zeit zwei Blutproben eines gesunden Kindes und eines Kindes, das im Verdacht stand, heterozygoter Galaktosämie-Träger zu sein, zur Untersuchung geschickt.
In Hämolysaten von Erythrozyten beider Proben wurden nach der oben angegebenen Methode die Enzymaktivitäten bestimmt.
Der Test war in Ordnung, und in dem Hämolysat des gesunden Kindes wurde eine doppelt so hohe GAL-1-PUT-Aktivität gefunden als in der anderen Probe.

2.5. Adenosin-5'-Monophosphat-Nucleotidase-Aktivität.

2.5.1. Methodik.

Test-Prinzip:

$$\text{Adenosin-5'-Monophosphat} + H_2O \xrightarrow{\text{5'-Nucleotidase}} \text{Adenosin} + \text{Phosphat}$$

Die Untersuchung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:
Bei diesen Untersuchungen wurde eine AMP-Lösung in Pufferlösung mit der zu untersuchenden Probe inkubiert.
Ein Zusatz von $Mn^{2+}$ soll vorhandene Aktivitäten aktivieren, während das zugesetzte $Ni^{2+}$ die spezifische 5'-Nucleotidase hemmt. Im Ansatz I mißt man also die Summe aus spezifischer

und unspezifischer 5'-Nucleotidase, während im Ansatz II nur die unspezifische Phosphatase-Aktivität gemessen wird. Aus der Differenz beider Ergebnisse kann man die Aktivität der spezifischen 5'-Nucleotidase allein berechnen.
Im Einzelnen wurde mit folgenden Lösungen und nach folgendem Schema gearbeitet:

Lösungen:

Alle Lösungen sind mit bidest. Wasser hergestellt.

1. Mangan(II)-sulfat (20 mM):
   3,38 g $MnSO_4$ mit Wasser ad 1000 ml lösen.
2. Veronal-Puffer (40 mM; pH = 7,5):
   8,25 g Veronal-Natrium in 700 ml Wasser lösen, mit 2 NHCl auf pH = 7,5 einstellen, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.
3. Nickelchlorid (0,1 M):
   23,77 $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ mit Wasser ad 1000 ml lösen.
4. Adenosin-5'-Monophosphat, AMP (10 mM):
   0,0499 g AMP-$Na_2$ in 10 ml Wasser lösen.
5. Trichloressigsäure (0,68 M):
   111,11 g $CCl_3COOH$ mit Wasser ad 1000 ml lösen.
6. Ammoniumheptamolybdat (40 mM):
   40,5 ml konz. $H_2SO_4$ in 109 ml Wasser einrühren,
   12,5 g Ammoniumheptamolybdat in 100 ml Wasser lösen und in 125 ml der verdünnten $H_2SO_4$ einrühren. Mit Wasser auf 1187,5 ml auffüllen.
7. Reduktionslösung:
   25 g Kaliumdisulfit in 60 ml Wasser lösen;
   0,2 g 4-Methylaminophenolsulfat in 10 ml Wasser lösen,
   beide Lösungen mischen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

Lösung filtrieren.

8. Natriumacetat (2,5 M):

85 g $CH_3COONa$ mit Wasser ad 437,5 ml lösen.

| Nacheinander in 15-ml-Zentr. gl. pipettieren | I | II | III | Konzentration im Test |
|---|---|---|---|---|
| Veronalpuffer (2) | 1,5 ml | 1,3 ml | 1,5 ml | ca. 30 mM |
| Mangan(II)-sulfatlösung (1) | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml | 1 mM |
| Nickelchloridls. (3) | - | 0,2 ml | - | 10 mM |
| Probe (Serum) | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml | |
| Wasser | - | - | 0,2 ml | |
| AMP-Lösung (4) | 0,2 ml | 0,2 ml | - | 1 mM |
| mischen, 30 min inkubieren (Wasserbad) | | | | |
| Trichloressigsäure (5) | 2,0 ml | 2,0 ml | 2,0 ml | |
| Die Enzymreaktionen sind gestoppt. Zentrifugieren (5 min, 3000 g); Niederschlag verwerfen. | | | | |
| Nacheinander in Reagenzgläser pipettieren: | | | | |
| Überstand | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | |
| Wasser + Molybdatlösung (6) | 9,5 ml | 9,5 ml | 9,5 ml | 4 mM |
| Reduktionslösung (7) | 1,0 ml | 1,0 ml | 1,0 ml | |
| mischen, 10 min stehen lassen. | | | | |
| Acetat-Lösung + Wasser (8) | 4,0 ml | 4,0 ml | 4,0 ml | 0,3 M |
| mischen, 10 min stehen lassen, Extinktionen messen. | | | | |

In Vorversuchen wurde zunächst geprüft, ob der Test funktioniert:

In einer Serie wurden anstelle von AMP-Lösung und Probe 0,05, 0,1, 0,15 und 0,2 ml einer 8 mM $Na_2HPO_4$-Lösung eingesetzt. Die gemessenen Extinktionen verhielten sich wie 1:2:3:4.

In einem zweiten Versuch wurde jede Extinktion doppelt abgelesen: Genau 5 min und 10 min nach Zugabe der Acetatlösung (Originalvorschrift). Die Meßwerte unterschieden sich nicht signifikant, und es wurde dann in späteren Versuchen immer 10 min stehen gelassen, weil so eine größere Probenzahl in einem Arbeitsgang untersucht werden konnte.

In einem dritten Vorversuch wurde eine größere Menge Probe, durch Zusammenkippen verschiedener Einzelproben erhalten, mit 30- und 60minütiger Inkubationsdauer untersucht. In diesem Versuch wurden überraschenderweise bei Verlängerung der Inkubationsdauer keine deutlich erhöhten Phosphatkonzentrationen gefunden. In der Annahme, daß allgemein noch zu kurze Zeit inkubiert wurde, wurden bei den folgenden Messungen an den Proben zweier kompletter WARBURG-Versuche allgemein 2 Std. inkubiert.

2.5.2. Ergebnisse:

Versuch N 1

| | ungesch. Hemisphäre | ödem. Hemisphäre |
|---|---|---|
| Kontrolle | keine Aktivität | keine Aktivität |
| Berolase® 100 ug/ml 1) | keine Aktivität | keine Aktivität |

Versuch A 14

| | | |
|---|---|---|
| Kontrolle | 0,032 µU/mg Tr. | keine Aktivität |
| F-1,6-$P_2$ | 0,067 µU/mg Tr. | keine Aktivität |

1) Cocarboxylase

Trotz des in Vorversuchen erfolgten Nachweises, daß unter meinen experimentellen Bedingungen anorganisches Phosphat exakt nachweisbar ist, wurden in den Proben der beiden großen WARBURG-Versuche N 1 keine und A 14 nur sehr geringe Aktivitäten von AMP-5'-Nucleotidase gefunden.
Da dieses Ergebnis die Untersuchung weiterer Proben nicht rechtfertigt, wurde auf die Durchführung weiterer Bestimmungen verzichtet.

## 2.6. Myokinase-Aktivität.

### 2.6.1. Methodik.

Test-Prinzip:

$$\text{A-5'-MP} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{MK}} 2\ \text{ADP}$$

$$2\ \text{ADP} + 2\ \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} 2\ \text{ATP} + 2\ \text{Pyruvat}$$

$$2\ \text{Pyruvat} + 2\ \text{NADH} + 2\ \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} 2\ \text{L-Lactat} + 2\ \text{NAD}^+$$

Bei diesem zusammengesetzten optischen Test wird das in der Myokinase-Reaktion gebildete ADP mit Phosphoenolpyruvat unter katalytischer Wirkung des Hilfsenzyms Pyruvat-Kinase zu ATP phosphoryliert. Das dabei aus dem PEP entstehende Pyruvat wird mit NADH und dem Hilfsenzym LDH zu Lactat hydriert, der NADH-Verbrauch pro Zeiteinheit ist ein Maß für die Myokinase--Aktivität.
Bei vorstehender Bestimmung stört das Pyruvat, das als ein Endprodukt des Stoffwechsels der Hirnschnitte in relativ hohen Konzentrationen in den Proben enthalten ist.
Eine zweite Störung könnte dadurch auftreten, daß die untersuchten Proben Aktivitäten von Adenosintriphosphatase enthalten. In diesem Fall würde ebenfalls während der Inkubation ADP gebildet werden. Die Folge wäre der Nachweis zu hoher

Myokinase-Aktivitäten. Diese Störmöglichkeiten wurden in folgender Weise ausgeschaltet:
Zunächst wurde die Probe in Pufferlösung mit allen Zusätzen (siehe Tabelle) außer ATP, PEP und AMP bis zur Extinktionskonstanz inkubiert. Bei dieser Inkubation wird alles Pyruvat der Proben beseitigt. Dann wurden ATP + PEP zugegeben; eine vorhandene ATP-ase-Aktivität würde sich in einer einsetzenden Extinktionsabnahme äußern. Es wurde jeweils nur eine sehr geringe Extinktionsänderung gefunden. Bei Eintreten von Extinktionskonstanz wurde abschließend durch Zugabe von AMP gestartet, dadurch konnte eine Myokinase-Aktivität gemessen werden. Die Extinktionsänderung wurde dann während 6 min verfolgt.

| | Reaktionslösung | | Reaktionsgemisch | |
|---|---|---|---|---|
| Substanzen | Konzentration mg/ml | Molarität mM | Testlösung ml | Endmolarität mM |
| TRA · HCl | 18,6 | 100 | 2,16 | 72,0 |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 4,6 | 18,8 | 0,17 | 1,1 |
| KCl | 175,2 | 2350 | | 13,3 |
| NADH, Na-Salz | 10 | 10,9 | 0,05 | 0,2 |
| PK, Suspension | 10 | | 0,05 | |
| LDH, Schwein | 5 | | 0,02 | |
| Probe | | | 0,05 | |
| ATP, Na-Salz | 6,7 | 10,8 | 0,30 | 1,1 |
| PEP, CHA-Salz | 1,7 | 3,6 | | 0,4 |
| AMP | 10 | 19 | 0,20 | 1,3 |

2.6.2. Ergebnisse.

Versuch F 7

| | ungesch. Hemisphäre | ödem. Hemisphäre |
|---|---|---|
| DNP 0,05 mM | 29,04 ± 4,1 mU/mg Tr. | 45,8 ± 3,6 mU/mg Tr. |

Versuch He II

| WARBURG-Ink. in min | Kontrolle |
|---|---|
| 35 | 13,97 ± 1,37 |
| 40 | 14,7 ± 4,2 |
| 50 | 13,5 ± 2,7 |
| 90 | 16,1 ± 2,1 |
| 130 | 15,18 ± 0,82 |
| 210 | 14,45 ± 0,9 |

Versuch Kl IV

| | |
|---|---|
| Fructose-1,6-$P_2$, Na-Salz | 21,18 mU/mg Tr. |
| Fructose-1,6-$P_2$, Ca-Salz | 17,52 mU/mg Tr. |
| Kontrolle 1 | 25,58 ± 8,8 mU/mg Tr. |
| Fructose-1,6-$P_2$, Na-Salz | 21,0 mU/mg Tr. |
| Fructose-1,6-$P_2$, Ca-Salz | 18,93 ± 1,4 mU/mg Tr. |
| Kontrolle 2 | 24,17 ± 0,45 mU/mg Tr. |

Versuch A 14

| | ungesch. Hemisphäre | ödem. Hemisphäre |
|---|---|---|
| Kontrolle | 49,46 ± 2,36 mU/mg Tr. | 50,8 ± 7,9 mU/mg Tr. |
| F-1,6-$P_2$ | 41,51 ± 0,45 mU/mg Tr. | 45,2 ± 3,41 mU/mg Tr. |

Im Gegensatz zu bisher angestellten Untersuchungen mit K-Lösungen, wurde bei diesen Versuchen eine relativ hohe Aktivität der Myokinase gefunden.

2.7. Adenosintriphosphatase-Aktivität?

Ausgehend von den auf Seite 15 ff beschriebenen Versuchen zur Bestimmung von AMP-5'-Nucleotidase-Aktivität wurde zunächst nach einer völlig analogen Methode gearbeitet. Es wurde lediglich an Stelle der 10 mM AMP-Lösung eine 10 mM ATP-Lösung eingesetzt. Außerdem wurde auf die Zusätze von Nickel- und Manganionen verzichtet.

Versuch 1:

In Veronalpuffer vom pH 7,5 wurden 30 min bei 37°C inkubiert:

1. 0,2 ml Probe + 0,2 ml ATP-Lösung
2. 0,2 ml Probe + 0,2 ml Wasser
3. 0,2 ml Wasser + 0,2 ml ATP-Lösung
4. 0,4 ml Phosphat-Standard.

Die Proben enthielten bereits 1,5 mM Phosphat aus der K-Lösung. Die ATP-Lösung allein wurde mit untersucht, um Verunreinigungen durch anorganisches Phosphat oder nicht-enzymatische Freisetzung von anorganischem Phosphat zu erfassen. Als Probe wurde eine Mischung aus verschiedenen Reaktionsgefäßen ohne Chemikalienzusätze (Versuch TR. 2) verwendet. Als Standard dienten 0,4 ml reiner K-Lösung mit 1,5 mM Phosphat.

Die gemessenen Extinktionen in den folgenden Tabellen sind noch durch den Faktor 1000 zu teilen.

Beispiel: 184/8 = 0,184/8 Die Ziffer nach dem Schrägstrich gibt die Photometer-Grobeinstellung an.

Versuch 1 Probe: Tr. 2 37°C

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Veronalpuffer | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Probe | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | — | — |
| $H_2O$ | — | — | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | — |
| Standard | — | — | — | — | — | — | — | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| ATP-Lsg. | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | — |
| | 30 min inkubiert | | | | | | | | | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg. timing 10 min | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg.+$H_2O$ | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 184/8 | 89/8 | 60/8 | 66/8 | 71/8 | 72/8 | 69/8 | 145/8 | 142/8 | 144/8 |

Ergebnisse:

Nach Inkubation der Proben mit ATP-Lösung ist nicht mehr anorganisches Phosphat vorhanden als in ATP-Lösungen, die die gleiche Zeit in Wasser ohne Probe inkubiert wurden. Aus diesem Versuch läßt sich keine ATP-ase-Aktivität nachweisen.

Versuch 2:

Zur Veranschaulichung der Anordnung eines Versuches sind in der folgenden Tabelle die Volumina aller Lösungen und die Meßwerte aller Ansätze angegeben.

Die Gläser Nr. 1 + 2 enthalten die eigentlichen Analysen; Gläser Nr. 3 + 4 enthalten einen Zusatz von Mg und K, um zu prüfen, ob diese Ionen stimmulierend wirken; Gläser Nr. 5 + 6

enthalten nur Probe, jedoch kein ATP, um den Phosphatgehalt der Proben zu erfassen; Gläser Nr. 7 + 8 enthalten nur ATP, jedoch keine Probe, um den Gehalt des ATPs an anorganischem Phosphat und die nicht-enzymatische Spaltung des ATPs zu erfassen; Gläser Nr. 9 + 10 enthalten reine K-Lösung als Standard, Phosphatgehalt wie in der K-Lösung der Proben 1,5 mM; Gläser Nr. 11 + 12 sind die Reagenzien-Leerwerte.

Versuch 2 Probe: Tr. 2 37°C

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Veronalpuffer | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Probe | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | — | — |
| $H_2O$ | 0,1 | 0,1 | — | — | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | — | — | 0,4 | 0,4 |
| Mg-K-Lsg | — | — | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — | — | — | 0,1 | 0,1 |
| ATP-Lsg | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — |
| Standard | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,5 | 0,5 | — | — |
| | 30 min inkubiert | | | | | | | | nicht inkubiert | | | |
| Trichloressigs | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg timing 10 min | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg+$H_2O$ | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 134/8 | 128/8 | 96/8 | 94/8 | 78/8 | 76/8 | 64/8 | 63/8 | 182/8 | 178/8 | 22/8 | 21/8 |
| Mittelwert | 131,5/8 | | 94,5/8 | | 77/8 | | 63,5/8 | | 180/8 | | 21,5/8 | |

**Ergebnisse:**

a. Im Standard mit 0,5 ml K-Lösung wurde wie zu erwarten das 2 1/2 fache der Phosphatmenge der Proben-Leerwerte (Gläser Nr. 5 + 6) gefunden. Kleine Differenzen können dadurch bedingt sein, daß Phosphat aus den Schnitten in die

Lösung diffundierte oder umgekehrt.

b. Nach Inkubation von ATP ohne Probe waren deutliche Mengen Phosphat nachweisbar.

c. In den Analysen (Gläser Nr. 1 + 2) war nicht mehr Phosphat enthalten, als aus den Leerwerten der Probe und des ATPs zu erwarten war. Es war also keine ATP-ase-Aktivität vorhanden.

d. Ein Zusatz von Magnesium und Kalium verringert die nachweisbare Menge von anorganischem Phosphat.

Versuch 3:

In diesem Versuch wurde nach dem selben Schema wie in Versuch 2 gearbeitet, der Versuch wurde jedoch nach zwei Richtungen erweitert:

1. Die Inkubationszeit wurde auf 1 Std. verlängert.

2. Es wurde außerdem nicht nur eine Sammelprobe eingesetzt, sondern eine K-Lösung aus einem Versuch mit normalen Hirnschnitten mit Zusatz von AMP und einer K-Lösung aus dem gleichen Versuch mit ödematösen Schnitten der anderen Hirnhälfte.

Versuch 3 Probe G I 37°C

I = Ö Probe II = G Probe III = G+AMP

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Veronalpuffer | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Probe | I 0,2 | I 0,2 | I 0,2 | I 0,2 | II 0,2 | II 0,2 | II 0,2 | II 0,2 | III 0,2 | III 0,2 | III 0,2 | III 0,2 | — | — | — | — | — | — |
| $H_2O$ | — | — | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,4 | 0,4 |
| ATP-Lsg. | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — |
| Standard | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,4 | 0,4 | — | — |
| | 1 Std. bei 37°C inkubiert | | | | | | | | | | | | | | nicht inkubiert | | | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg. timing 10 min | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg. | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 99/8 | 97/8 | 81/8 | 86/8 | 150/8 | 148/8 | 82/8 | 84/8 | 113/8 | 115/8 | 114/8 | 106/8 | 73/8 | 74/8 | 146/8 | 148/8 | 35/8 | 38/8 |
| Mittelwert | 98/8 | | 83,5/8 | | 149/8 | | 83/8 | | 114/8 | | 110/8 | | 73,5/8 | | 147/8 | | 36,5/8 | |

Ergebnisse:

Weder durch die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 1 Std., noch durch Untersuchung von Lösung mit AMP-Zusatz oder Lösung mit Inhaltsstoffen ödematöser Hirnschnitte, ließ sich ATP-ase nachweisen.

Versuch 4:

Weil in den vorangegangenen Versuchen keine ATP-ase-Aktivität nachweisbar war, wurde in diesem Versuch die Inkubationsdauer auf 2 Std. verlängert. Außerdem wurde geprüft, ob latente ATP-ase-Aktivitäten durch Mn, Mg oder K zu aktivieren sind, und schließlich wurde die Spaltbarkeit des ATPs und die genaue Nachweisbarkeit des anorganischen Phosphates noch einmal dadurch überprüft, daß in einem Doppelansatz jeweils 2 µMol ATP pro Ansatz 7 min in 0,1 N HCl auf 100°C erhitzt wurden.

Versuch 4 Probe Kl. 4 37°C (Glas 1+2 7 min Phosphat)

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HCl 1N | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| $H_2O$ | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | — | — | 0,3 | 0,3 |
| Veronalpuffer | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Probe | — | — | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — |
| Manganlsg. | — | — | — | — | — | — | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — | — | — | 0,1 | 0,1 |
| Mg-K-Lsg. | — | — | — | — | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,1 | 0,1 |
| Standard | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,5 | 0,5 | — | — |
| ATP-Lsg. | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | — | — |
| | 7 min. bei 100°C gekocht | | 2 Std. bei 37°C inkubiert | | | | | | | | | | nicht inkubiert | | | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg. timing 10 min | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg. | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 135/10 | 137/10 | 198/8 | 192/8 | 124/8 | 118/8 | 115/8 | 114/8 | 61/8 | 62/8 | 73/8 | 75/8 | 170/8 | 165/8 | 39/8 | 38/8 |
| Mittelwert | 136/10 | | 195/8 | | 121/8 | | 114,5/8 | | 61,5/8 | | 74/8 | | 167,5/8 | | 38,5/8 | |

Ergebnisse:

a. Probe allein: 24 mU pro ml Probe

Probe + Mg und K: 6 mU pro ml Probe

Probe + Mn: 4 mU pro ml Probe

Diese Werte sind allgemein niedrig. Sie zeigen die schon in Versuch 2 nachgewiesene Erniedrigung der $PO_4$-Konzentration in Gegenwart von Mg und K und auch von Mn, darüber hinaus zeigen sie aber auch die relative Trägheit der Meßmethode, verglichen mit NADH-abhängigen Enzymaktivitätsbestimmungen. Bei der sauren Hydrolyse von 2 µMol ATP wurden 3,5 µMol Phosphat gebildet. Daraus geht hervor, daß die 3. Phosphatgruppe aus dem ATP vollständig, und die 2. Phosphatgruppe zu 75% abgespalten wurde.

Versuch 5:

In vorangegangenen Versuchen wurden die Proben bereits unterschiedliche Zeiten mit ATP inkubiert. Das Ergebnis machte keinen einheitlichen Eindruck, es wurden allgemein keine, oder sehr geringe ATP-ase-Aktivitäten nachgewiesen. Zur genaueren Überprüfung der Zeitabhängigkeit wurde Versuch 5 mit Inkubationszeiten von 30, 60 und 120 min durchgeführt. Die Phosphatmengen die gefunden wurden, verhielten sich nicht wie 1:2:4, sondern nahmen sogar ab.

Versuch 5 Probe Tr.15
Methodischer Test zur Zeitabhängigkeit der Inkubation bei 37°C

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Veronalpuffer | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Probe | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| ATP-Lsg. | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Inkubation | 30 min | | 1 Std | | 2 Std | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg. timing 10 min | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg.+$H_2O$ | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 213/8 | 209/8 | 175/8 | 178/8 | 149/8 | 153/8 |
| Mittelwert | 210,5/8 | | 176,5/8 | | 151/8 | |

Versuch 6:

Alle vorangegangenen Versuche waren mit wechselnden Inkubationszeiten in Veronalpuffer durchgeführt worden.
In diesem Versuch sollte nun geprüft werden, ob vielleicht das Veronal auf die ATP-ase hemmend wirkt. Deshalb wurde der bereits bei anderen Enzymbestimmungen verwendete Triäthanolamin-Puffer (LITSCH)(10) vom pH 7,6 verwendet. Außerdem wurde die Erfahrung des vorangegangenen Versuches berücksichtigt und nur 30 min inkubiert.

Versuch 6 Probe: Tr. 15 Vergleich Veronal Puffer - TRA Puffer bei 37°C inkubiert

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Veronalpuffer | 1,5 | 1,5 | — | — | — | — | — | — | 1,5 | 1,5 | — | — | — | — |
| TRA-Puffer | — | — | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | — | — | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| $H_2O$ | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | — | — | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,1 |
| Probe | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,2 | 0,2 |
| Standard | — | — | — | — | 0,5 | 0,5 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Mg-K-Lsg. | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,1 | 0,1 |
| ATP-Lsg. | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| | 30 min inkubiert | | | | nicht inkubiert | | | | 30 min inkubiert | | | | | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg. timing 10 min | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg. | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 208/8 | 212/8 | 268/8 | 262/8 | 169/8 | 171/8 | 47/8 | 49/8 | 63/8 | 61/8 | 68/8 | 66/8 | 196/8 | 190/8 |
| Mittelwert | 210/8 | | 265/8 | | 170/8 | | 48/8 | | 62/8 | | 67/8 | | 193/8 | |

Ergebnisse:

In Veronal-Puffer: 25 mU pro ml Probe

In TRA-Puffer: 38 mU pro ml Probe

In TRA-Puffer + Mg + K: 19 mU pro ml Probe

Aus diesen Ergebnissen erkennt man deutlich die Hemmwirkung von Veronal-Puffer auf vorhandene ATP-ase-Aktivität und die Verringerung des anorganischen Phosphates in Gegenwart von Magnesium und Kalium.

Es ist zu fragen, ob die bereits in mehreren Versuchen beobachtete Erniedrigung der $PO_4$-Konzentration in Gegenwart von $Mg^{2+}$ und $K^+$ echt ist, oder ob bei der quantitativen Bestimmung in Gegenwart der beiden Ionen lediglich niedrigere Werte gefunden werden. Zur experimentellen Prüfung dieser Fragen wurden die Phosphatbestimmungen in 0,3 mM Phosphatlösungen nach der von mir ausgearbeiteten Methode durchgeführt.

Zur Hälfte der Bestimmungen wurden $Mg^{2+}$ (15 mM) und $K^+$ (50 mM) gegeben. In beiden Fällen wurden die gleichen Phosphatmengen gefunden. Das heißt: Die Erniedrigung der Phosphatwerte ist echt. Die Abspaltung von anorganischem Phosphat aus ATP und, wie aus späteren Versuchen hervorgeht, auch aus PEP verläuft also tatsächlich in Gegenwart von Magnesium- und Kalium-Ionen langsamer.

Versuch 7:

In vorangegangenen Untersuchungen (LITSCH)(10) war versucht worden, für die Bestimmung von ATP-ase-Aktivitäten einen zusammengesetzten optischen Test auszuarbeiten. Dieser Test sollte über folgende Reaktionsgleichungen gehen:

$ATP \xrightarrow{ATP\text{-}ase} ADP + Pi$

$ADP + PEP \xrightarrow{PK} ATP + Pyruvat$

$Pyruvat + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} Lactat + NAD^+$

Für diesen Test wurden optimale Bedingungen ermittelt.
In Gegenwart von Proben lief auch tatsächlich eine Reaktion ab, denn die durch das NADH bedingte Absorption im UV nahm laufend ab. Streng genommen ist aber damit nur bewiesen, daß PEP in Pyruvat umgewandelt wurde.
Zur Klärung der Reaktionfolge mußte noch bewiesen werden, daß im Laufe der Inkubationen tatsächlich anorganisches Phosphat abgespalten wird. Zu diesem Zweck wurden die jetzt folgenden Versuche durchgeführt.
Im Versuch 7 wurde zunächst geprüft, ob PEP allein in Gegenwart von Probe Phosphat abspaltet, ob dieser Vorgang durch $Mg^{2+}$ und $K^+$ aktivierbar ist, und ob die Phosphatabspaltung in Gegenwart von ATP + PEP stärker ist.
Versuchsanordnung und Ergebnisse gehen aus der folgenden Tabelle hervor.

Versuch 7 Probe: Tr. 15 Vergleich TRA-Puffer - ATP-PEP-(PEP+ATP) bei 37° inkubiert

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TRA-Puffer | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 |
| Probe | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | — | — | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,2 | 0,2 |
| Standard | — | — | — | — | 0,8 | 0,8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Mg-K-Lsg. | — | — | — | — | — | — | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — | 0,1 | 0,1 |
| $H_2O$ | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | — | — | 0,7 | 0,7 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,1 |
| ATP-Lsg. | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| PEP-Lsg. | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| | 30 min inkubiert | | | | nicht inkubiert | | | | 30 min inkubiert | | | | | | | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg. timing 10 min | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg. | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 310/8 | 306/8 | 54/8 | 52/8 | 284/9 | 288/9 | 47/8 | 49/8 | 150/8 | 147/8 | 162/8 | 158/8 | 92/8 | 96/8 | 137/8 | 131/8 |
| Mittelwert | 308/8 | | 55/8 | | 286/9 | | 48/8 | | 148,5/8 | | 160/8 | | 94/8 | | 134/8 | |

Bei Berücksichtigung der Phosphatmengen, die im Leerwert (Gläser Nr. 7 + 8) gefunden wurden, der Phosphatmengen, die nach Inkubation von PEP ohne Probe vorlagen (Gläser Nr. 3 + 4) und der ohnehin in den Proben von der K-Lösung her enthaltenen Phosphatmengen (1/4 der Standardansätze mit den Gläsern Nr. 5 + 6) bleiben noch beträchtliche Phosphatmengen übrig, die in den Gläsern Nr. 1 + 2 bei Inkubationen von PEP mit Proben freigesetzt wurden. Bei rechnerischer Auswertung ergibt sich eine Aktivität von 53 mU "PEP-ase"/ml Probe.
In Gegenwart von $Mg^{2+}$ und $K^{+}$ sowie von ATP sind diese Phosphatmengen sehr stark verringert.
Die Konzentration von anorganischem Phosphat ist andererseits nach Inkubation mit PEP + ATP so gering, daß sich bei Berücksichtigung der Leerwerte daraus keine ATP-ase-Aktivität berechnen läßt.

Versuch 8:

Im Versuch 7 war eine "PEP-ase"-Aktivität nachgewiesen worden. In Gegenwart von zusätzlich vorhandenem ATP wurde jedoch kein anorganisches Phosphat enzymatisch aus PEP freigesetzt. Deshalb habe ich im vorliegenden Versuch untersucht, ob wenigstens für die Abspaltung von $PO_4$ aus PEP allein oder ATP allein eine Zeitabhängigkeit besteht. Die Frage heißt also: Werden bei längeren Inkubationszeiten größere Phosphatmengen freigesetzt?
Weil der optische Test im allgemeinen bei 25°C durchgeführt wird, wurden diese und alle folgenden Messungen ebenfalls bei 25°C durchgeführt.
Versuchsanordnung und Ergebnisse sind aus der folgenden

Tabelle abzulesen.

Versuch 8 Probe: Tr. 15 . Zeitabhängigkeit (Inkubation) 15, 30, 45 min ATP-PEP in TRA-Puffer bei 25°C

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TRA-Puffer | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 |
| Probe | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| $H_2O$ | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | — | — | 0,8 | 0,8 |
| Standard | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,8 | 0,8 | — | — |
| PEP-Lsg. | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | — | — | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — | — | — |
| ATP-Lsg. | — | — | — | — | — | — | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | — | — | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — |
| Inkubation in min | 15 | 15 | 30 | 30 | 45 | 45 | 15 | 15 | 30 | 30 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | nicht inkubiert | | | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg. timing 10 min | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg. | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 198/8 | 202/8 | 172/8 | 170/8 | 135/8 | 135/8 | 96/8 | 100/8 | 68/8 | 72/8 | 67/8 | 67/8 | 140/8 | 138/8 | 46/8 | 46/8 | 280/8 | 284/8 | 46/8 | 45/8 |
| Mittelwert | 200/8 | | 171/8 | | 135/8 | | 98/8 | | 70/8 | | 67/8 | | 139/8 | | 46/8 | | 282/8 | | 45 5/8 | |

Der Versuch zeigt folgendes:

Bei Inkubationen von PEP und ATP werden nach 15 min jeweils die höchsten Phosphatmengen gefunden. Längere Inkubationsdauer verursacht geringere $PO_4$-Konzentrationen. Dieses Ergebnis spricht eindeutig gegen eine "PEP-ase"- oder ATP-ase-Aktivität. Aber selbst nach 15 min Inkubationsdauer sind die Phosphatmengen so gering, daß nach Abzug von Reagenzienleerwerten (Gläser Nr. 19 + 20), Substratleerwerten (Gläser Nr. 13 + 14) und 1/4 der Extinktionen des Standards (wegen des Phosphatgehaltes der Proben) im Rahmen der erzielbaren Meßgenauigkeiten praktisch die Extinktion null resultiert.

Versuche 9, 10, 11:

In diesen Versuchen sollte für den in Versuch 7 bereits erwähnten optischen Test durch Kombination von Phosphatbestimmungen und Messungen des NADH-Verbrauches geprüft werden, ob tatsächlich ATP in ADP + $P_i$ gespalten wird. Außerdem sollte die Zeitabhängigkeit untersucht werden, und es sollten Einzelheiten zur möglichen Verbesserung der experimentellen Methodik ausgearbeitet werden.

Anordnung Versuch 9:

Das vollständige System (bestehend aus TRA-Puffer, $Mg^{2+}$, $K^+$, NADH, PK und LDH) wird zunächst 10 min mit PEP inkubiert (Messung der Extinktion bei 334 nm), dann wird 10 min mit zusätzlichem ATP inkubiert, dann wird 0 oder 15 oder 30 min mit zusätzlicher Probe inkubiert.

Bei allen Inkubationen wird die Extinktion gemessen.

Anordnung Versuch 10:

Das vollständige System wird zunächst 10 min mit ATP, dann

0 oder 15 oder 30 min mit Probe inkubiert.

Anschließend werden die 15 oder 30 min mit Probe inkubierten Ansätze noch 10 min mit PEP inkubiert.

Anordnung Versuch 11:

Das vollständige System wird zunächst 10 min mit PEP, dann 10 min mit Probe und abschließend 0 oder 15 oder 30 min mit ATP inkubiert.

Temperatur aller Inkubationen 25°C; es wurde stets die gleiche Probe verwendet, die durch Sammeln der Inkubationslösungen mehrerer Reaktionsgefäße in größerer Menge erhalten wurde.

Bei allen Inkubationen wurde die Extinktion gemessen; das Ende jeder Inkubation erfolgte durch Zugabe von Trichloressigsäure zu den angegebenen Zeiten.

Nach Enteiweißung wurde in allen Ansätzen die Konzentration des anorganischen Phosphates bestimmt.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse des optischen Tests sind in folgenden Tabellen zusammengefaßt:

Versuch 9:

| | Gläser Nr. 1 + 2 | Gläser Nr. 3 + 4 |
|---|---|---|
| 3 - 10 min | 23,1 ± 0,3 | 24,0 ± 0,3 |
| 10 - 15 min | 21,2 ± 0,2 | 20,8 ± 0,4 |
| 15 - 20 min | | 18,3 ± 0,4 |
| 20 - 25 min | | 16,7 ± 0 |
| 25 - 30 min | | 15,1 ± 0,1 |

Einheit: mU/ml Sammelprobe

Versuch 10:

| | Gläser Nr. 3 + 4 | Gläser Nr. 5 + 6 |
|---|---|---|
| 3 - 10 min | 12,1 ± 0,2 | 9,5 ± 0,3 |

Einheit: mU/ml Sammelprobe

Versuch 11:

| | Gläser Nr. 3 + 4 | Gläser Nr. 5 + 6 |
|---|---|---|
| 3 - 10 min | 24,4 ± 0,8 | 22.8 ± 1,1 |
| 10 - 15 min | 20,5 ± 1,6 | 18,5 ± 0,8 |
| 15 - 20 min | | 16,8 ± 0,2 |
| 20 - 25 min | | 14,8 ± 0,5 |
| 25 - 30 min | | 13,2 ± 0,2 |

Einheit: mU/ml Sammelprobe

Weil die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Versuchsdauer abnahm, sind die errechneten Aktivitäten für verschiedene Zeitintervalle gesondert angegeben. Grundsätzlich wurden die ersten 2 min nach Start der Reaktion rechnerisch nicht ausgewertet, weil in diesem Zeitraum gelegentlich noch starke Schwankungen der Extinktionen auftraten.

Versuch 9 Probe Tr. 15 25°C
Kombination Phosphatbestimmung - NADH-Verbrauchsmessung

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TRA-Puffer | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 |
| Mg-K-Lsg. | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — |
| NADH-Lsg. | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | — | — | — | — |
| PK-Lsg. | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | — | — | — | — |
| LDH-Lsg | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | — | — | — | — |
| $H_2O$ | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,78 | 0,78 |
| Standard | — | — | — | — | — | — | 0,78 | 0,78 | — | — |
| PEP 0-10 min 0,2 ml | 483/13 | 605/13 | 430/13 | 610/13 | 455/13 | 510/13 | | | | |
| ATP 0,2 ml 1 min | 410/11 | 465/11 | 320/11 | 460/11 | 330/11 | 385/11 | | | | |
| 2 | 401 | 460 | 310 | 450 | 329 | 385 | | | | |
| 3 | 401 | 460 | 309 | 450 | 330 | 384 | | | | |
| 4 | 401 | 460 | 310 | 450 | 330 | 385 | | | | |
| 5 | 400 | 460 | 309 | 449 | 329 | 385 | | | | |
| 6 | 400 | 450 | 309 | 450 | 329 | 385 | | | | |
| 7 | 400 | 460 | 310 | 450 | 329 | 385 | | | | |
| 8 | 399 | 460 | 310 | 449 | 330 | 384 | | | | |
| 9 | 400 | 459 | 310 | 450 | 329 | 384 | | | | |
| 10 | 400 | 459 | 310 | 449 | 329 | 384 | | | | |
| Probe 0,2 ml 0 min | 198/11 | 250/11 | 345/10 | 480/10 | 375/10 | 425/10 | | | | |
| 1 | 185 | 234 | 327 | 465 | | | | | | |
| 2 | 175 | 218 | 311 | 449 | | | | | | |
| 3 | 162 | 202 | 295 | 425 | | | | | | |
| 4 | 148 | 190 | 279 | 415 | | | | | | |
| 5 | 134 | 174 | 265 | 400 | | | | | | |
| 6 | 122 | 159 | 250 | 384 | | | | | | |
| 7 | 108 | 146 | 235 | 369 | | | | | | |
| 8 | 96 | 133 | 221 | 354 | | | | | | |
| 9 | 82 | 120 | 208 | 339 | | | | | | |
| 10 | 70 | 106 | 194 | 325 | | | | | | |
| 15 | 7 | 42 | 133 | 261 | | | | | | |
| 20 | | | 79 | 205 | | | | | | |
| 25 | | | 29 | 155 | | | | | | |
| 30 | | | 233/9 | 110 | | | | | | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg+$H_2O$ | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 276/6 | 274/6 | 251/6 | 226/6 | 207/6 | 200/6 | 360/6 | 370/6 | 65/6 | 65/6 |
| Mittelwert | 275/6 | | 238/6 | | 203,5/6 | | 365,5/6 | | 65/6 | |

Versuch 10 Probe Tr.15 25°C

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TRA-Puffer | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 |
| Mg-K-Lsg. | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — |
| NADH-Lsg. | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | — | — | — | — |
| PK-Lsg. | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | — | — | — | — |
| LDH-Lsg. | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | — | — | — | — |
| $H_2O$ | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,78 | 0,78 |
| Standard | — | — | — | — | — | — | 0,78 | 0,78 | — | — |
| ATP 0-10min 0,2 ml | 385/12 | 375/12 | 410/12 | 405/12 | 425/12 | 390/12 | | | | |
| Probe 0,2 ml 0min | 370/11 | 360/11 | 400/11 | 385/11 | 410/11 | 380/11 | | | | |
| 1 " | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| 2 " | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| 3 " | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| 4 " | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| 5 " | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| 6 " | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| 7 " | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| 8 " | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| 9 " | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| 10 " | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| 15 " | | | 400/11 | 385/11 | ↓ | ↓ | | | | |
| 20 " | | | | | ↓ | ↓ | | | | |
| 25 " | | | | | ↓ | ↓ | | | | |
| 30 " | | | | | 410/11 | 380/11 | | | | |
| PEP 0,2 ml 0min | | | 500/8 | 215/9 | 390/8 | 380/8 | | | | |
| 1 " | | | 463 " | 198 " | 123/9 | 347 " | | | | |
| 2 " | | | 455 " | 190 " | 115 " | 340 " | | | | |
| 3 " | | | 446 " | 182 " | 108 " | 333 " | | | | |
| 4 " | | | 189/9 | 174 " | 103 " | 326 " | | | | |
| 5 " | | | 182 " | 166 " | 97 " | 321 " | | | | |
| 6 " | | | 174 " | 159 " | 91 " | 316 " | | | | |
| 7 " | | | 166 " | 152 " | 85 " | 310 " | | | | |
| 8 " | | | 160 " | 144 " | 79 " | 305 " | | | | |
| 9 " | | | 154 " | 137 " | 73 " | 299 " | | | | |
| 10 " | | | 148 " | 131 " | 68 " | 294 " | | | | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg. | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg+$H_2O$ | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 254/6 | 256/6 | 245/6 | 240/6 | 191/6 | 186/6 | 250/6 | 256/6 | 56/6 | 58/6 |
| Mittelwert | 255/6 | | 242,5/6 | | 188,5/6 | | 253/6 | | 57/6 | |

Probe Eiweißfällung mit Trichloressigsäure. Nach Zugabe der

Versuch 11 Mischprobe Tr. 15 25°C

| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TRA-Puffer | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 |
| Mg-K-Lsg. | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — |
| NADH-Lsg. | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | — | — | — | — |
| PK-Lsg. | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | — | — | — | — |
| LDH-Lsg. | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | — | — | — | — |
| $H_2O$ | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,78 | 0,78 |
| Standard | — | — | — | — | — | — | 0,78 | 0,78 | — | — |
| PEP 0-10min 0,2 ml | 435/12 | 410/12 | 485/12 | 410/12 | 510/12 | 410/12 | | | | |
| Probe 0-10min 0,2 ml | 385/11 | 350/11 | 430/11 | 360/11 | 460/11 | 370/11 | | | | |
| ATP 0min | 350/9 | 325/9 | 400/9 | 330/9 | 430/9 | 340/9 | | | | |
| 0,2 ml 1 " | | | 390 " | 312 " | 410 " | 324 " | | | | |
| 2 " | | | 375 " | 295 " | 394 " | 310 " | | | | |
| 3 " | | | 359 " | 280 " | 379 " | 295 " | | | | |
| 4 " | | | 341 " | 265 " | 363 " | 281 " | | | | |
| 5 " | | | 325 " | 250 " | 348 " | 267 " | | | | |
| 6 " | | | 310 " | 236 " | 334 " | 255 " | | | | |
| 7 " | | | 295 " | 222 " | 320 " | 242 " | | | | |
| 8 " | | | 281 " | 208 " | 306 " | 230 " | | | | |
| 9 " | | | 267 " | 195 " | 293 " | 218 " | | | | |
| 10 " | | | 254 " | 182 " | 281 " | 206 " | | | | |
| 15 " | | | 195 " | 117 " | 223 " | 153 " | | | | |
| 20 " | | | | | 172 " | 103 " | | | | |
| 25 " | | | | | 126 " | 60 " | | | | |
| 30 " | | | | | 86 " | 21 " | | | | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktionslsg | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg +$H_2O$ | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 320/6 | 311/6 | 285/6 | 279/6 | 227/6 | 220/6 | 250/6 | 248/6 | 56/6 | 58/6 |
| Mittelwert | 315,5/6 | | 282/6 | | 223,5/6 | | 249/6 | | 57/6 | |

Aus den Tabellen geht folgendes hervor:
Es wurden allgemein im optischen Test beträchtliche Enzymaktivitäten gefunden; die freigesetzten Phosphatmengen nahmen jedoch mit zunehmender Reaktionsdauer stark ab.
In den Anordnungen der Versuche 9 + 11 wurden größenordnungsmäßig gleiche Aktivitäten gefunden, während in Anordnung Versuch 10 nur etwa halb so hohe Aktivitäten meßbar waren.
Das Gemeinsame der Versuche 9 + 11 ist, daß erst in der letzten Phase des Versuches, in der dann auch die Extinktion gemessen wurde, ATP und Probe miteinander reagieren konnten.
Bei Anordnung Versuch 10 wurde zwar auch erst in der letzten Phase des Versuches eine Extinktionsänderung beobachtet, ATP und Probe konnten aber bereits vom Beginn der 2. Phase an miteinander reagieren; in der 3. Phase des Versuches befindet man sich also bereits in einem wesentlich späteren Zeitpunkt der ATP-Probe-Reaktion und hat zwangsläufig wegen der Abnahmen der Geschwindigkeit mit der Zeit nun geringere Aktivitäten zu erwarten.
Kurz zusammengefaßt bedeutet dies:
Eine optische Verfolgung der Reaktion wird erst durch Zugabe von PEP möglich, weil erst dann die Hilfsreaktionen, die zum Verbrauch von NADH führten, ablaufen können; die eigentliche Reaktion findet aber zwischen ATP und einem in der Probe enthaltenen Enzym statt.
Eine andere Beobachtung stützt ebenfalls die Behauptung, daß in Gegenwart von Probe eine Reaktion abläuft, bei der aus ATP ADP entsteht.
In Anordnung Versuch 9 betrugen in den Gefäßen Nr. 1, 2, 3

und 4 die Extinktionsänderungen zwischen Ende ATP-Inkubation (Phase 2) und Beginn Probe-Inkubation (Phase 3) 0,202, 0,179, 0,215 und 0,220.

In Anordnung Versuch 10 betrugen dagegen die Extinktionsänderungen in den Gläsern Nr. 3, 4, 5 und 6 zu Beginn der 3. Phase 0,650, 0,670, 0,770 und 0,750.

In Anordnung Versuch 11 schließlich betrugen die Extinktionsänderungen in den Gläsern Nr. 3, 4, 5 und 6 zum Beginn der 3. Phase immer 0,530.

Das heißt:

In Anordnung Versuch 9 wurde mit Zugabe der Probe nur das in der Probe selbst enthaltene Pyruvat hydriert, dabei wird NADH verbraucht. Verunreinigungen von Pyruvat im PEP und ADP im ATP waren schon in den ersten beiden Versuchsphasen unter NADH-Verbrauch beseitigt worden.

In der Anordnung Versuch 10 wurde dagegen mit Zugabe der PEP--Lösung neben den erwähnten Verunreinigungen auch das ADP beseitigt, welches sich während Phase 2 des Versuches aus ATP + Probe gebildet hatte. Es ist deutlich sichtbar, daß eine Verdopplung der Reaktionsdauer in Phase 2 auch eine Erhöhung des Extinktionssprunges um 0,100 hervorruft.

In Anordnung Versuch 11 wurden relativ hohe, aber immer gleiche Extinktionsänderungen gemessen. Diese wurden durch Phosphorylierung, und dadurch bedingten PEP-Verbrauch des ADPs, das als Verunreinigung im ATP enthalten ist, hervorgerufen. Man kann aus der gemessenen Extinktionsänderung berechnen, wieviel ADP als Verunreinigung in ATP enthalten war:

$\Delta E = 0{,}530 \quad V = 2{,}0$ ml $\quad v = 0{,}2$ ml

$C = \frac{E \cdot V}{6 \cdot v} = 0{,}88$ µMol ADP/ml ATP-Lösung

Die verwendete ATP-Lösung war 43 mM, also enthielt sie $\frac{88}{43} \approx 2\%$ ADP als Verunreinigung.

Die Auswertung der Phosphatbestimmungen ergibt folgendes: Der Phosphatgehalt der verwendeten K-Lösung ist 1,5 mM. Wenn man 0,2 ml Probe mit den anderen Reagenzien auf ein Gesamtvolumen von 2,0 ml verdünnt, hat man also von der K-Lösung her eine Konzentration von 0,15 mM $P_i$ zu erwarten. Folgende Konzentrationen wurden in den einzelnen Ansätzen gefunden:

| | Inkubationsdauer | | |
|---|---|---|---|
| Anordnung | 0 min | 15 min | 30 min |
| Versuch 9 | 0,29 mM | 0,44 mM | 0,36 mM |
| Versuch 10 | 0,64 mM | 0,60 mM | 0,42 mM |
| Versuch 11 | 0,85 mM | 0,74 mM | 0,55 mM |

Das heißt:

Es wurde stets mehr Phosphat gefunden als von der K-Lösung her zu erwarten war. Dieses Phosphat stammt wohl aus Hirnschnitten und ist möglicherweise auch in einigen Reagenzien als Verunreinigung enthalten. Das Überraschende ist aber, daß nur in der Anordnung Versuch 9 zwischen der Inkubationsdauer 0 min und der Inkubationsdauer 15 min die Phosphatkonzentration zunimmt. Bei weiterer Inkubation dieser Anordnung und in den beiden anderen Anordnungen nahm die Phosphatkonzen-

tration ständig ab. Auffällig ist, daß die Abnahme der Phosphatkonzentration mit zunehmender Versuchsdauer schneller verläuft. Auffällig ist ferner, daß die höchste Phosphatkonzentration, 0,85 mM, dort erhalten wurde, wo Probe + PEP jedoch ohne ATP inkubiert wurden.

Diese Beobachtung ist zwar nicht von mir erklärbar, weil ein NADH-Verbrauch während dieser Zeit nicht stattfand; es besteht aber völlige Analogie zu Versuch 7, wo ebenfalls bei Inkubation von PEP + Probe allein die höchsten Konzentrationen von anorganischem Phosphat erhalten wurden.

Man kann aus der Phosphatfreisetzung im ersten 15 min Intervall der Anordnung Versuch 9 die "ATP-ase-Aktivität" berechnen und erhält dann 99 mU/ml; dieser Wert liegt aber unter der Hälfte des im gleichen Zeitraum mittels des optischen Tests ermittelten Wertes.

Zusammenfassend muß man aus den Messungen folgern, daß zwar ATP gespalten wurde, doch nur im Anfang der Inkubationen bildete sich anorganisches Phosphat. Später setzten mit zunehmender Geschwindigkeit eine oder mehrere Reaktionen ein, die $PO_4$ direkt oder aus dem ATP auf andere Substrate übertrugen. Es wurde also über längere Zeit keine ATP-ase-Aktivität gemessen.

Versuch 12:

In früheren Versuchen (LITSCH)(10) war festgestellt worden, daß in Lösungen keine "ATP-ase"-Aktivität gefunden wurde, wenn während des vorhergegangenen WARBURG-Versuches den Suspensionen der Hirnschnitte Glycerinaldehyd zugesetzt worden war.

In dem von mir durchgeführten Versuch sollte diese Beobachtung

überprüft werden; außerdem sollte das Ergebnis des optischen Tests mit dem Ergebnis von Phosphatbestimmungen verglichen werden.

| Probe Nr. | 94 | 92 | 57 | 46 | 82 | 65 | 94 | 94 | 92 | 92 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glas Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| TRA-Puffer | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 |
| Mg-K-Lsg. | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| NADH-Lsg. | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| PK-Lsg. | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 |
| LDH-Lsg. | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 |
| Standard | | | | | | | | | | |
| $H_2O$ | | | | | | | | | | |
| PEP min 0-10 0,2 ml | 370/12 | 420/12 | 400/12 | 350/12 | 370/12 | 365/12 | 340/12 | 410/12 | 345/12 | 415/12 |
| Probe min 0-10 0,2 ml | 360/11 | 365/11 | 385/11 | 300/11 | 395/11 | 370/11 | 330/11 | 385/11 | 300/11 | 360/11 |
| ATP min 0 | 370/9 | 355/9 | 380/9 | 310/9 | 385/9 | 365/9 | 350/9 | 395/9 | 330/9 | 380/9 |
| 0,2 ml " 1 | | | | | | | 307 " | 350 " | 295 " | 350 " |
| " 2 | | | | | | | 288 " | 332 " | 275 " | 325 " |
| " 3 | | | | | | | 269 " | 315 " | 255 " | 304 " |
| " 4 | | | | | | | 252 " | 298 " | 234 " | 284 " |
| " 5 | | | | | | | 234 " | 281 " | 215 " | 264 " |
| " 6 | | | | | | | 217 " | 263 " | 196 " | 246 " |
| " 7 | | | | | | | 202 " | 244 " | 180 " | 227 " |
| " 8 | | | | | | | 186 " | 228 " | 163 " | 210 " |
| " 9 | | | | | | | 172 " | 211 " | 146 " | 193 " |
| " 10 | | | | | | | 157 " | 197 " | 130 " | 177 " |
| " 11 | | | | | | | 143 " | 183 " | 115 " | 162 " |
| " 12 | | | | | | | 130 " | 160 " | 101 " | 148 " |
| " 13 | | | | | | | 116 " | 143 " | 87 " | 134 " |
| " 14 | | | | | | | 104 " | 130 " | 74 " | 120 " |
| " 15 | | | | | | | 92 " | 117 " | 62 " | 108 " |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,4 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktion | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg.+$H_2O$ | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 297/6 | 276/6 | 244/6 | 209/6 | 195/6 | 163/6 | 313/6 | 315/6 | 265/6 | 255/6 |
| Mittelwert | | | | | | | 314/6 | | 260/6 | |

Nach ATP-Zugabe sofort Eiweißfällung mit Trichloressigsäure

Versuch 12

| Probe Nr. | 57 | 57 | 46 | 46 | 82 | 82 | 65 | 65 | St-K-Lsg. | | Leerwert | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glas Nr. | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
| TRA-Puffer | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 | 1,22 |
| Mg-K-Lsg. | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — |
| NADH-Lsg. | 0,04 | 0,04 | 0,4 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | — | — | — | — |
| PK-Lsg. | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | — | — | — | — |
| LDH-Lsg. | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | 0,035 | — | — | — | — |
| Standard | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,84 | 0,84 | — | — |
| $H_2O$ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,84 | 0,84 |
| PEP min 0-10 0,2 ml | 350/12 | 305/12 | 510/12 | 355/12 | 430/12 | 315/12 | 440/12 | 530/12 | — | — | — | — |
| Probe min 0-10 0,2 ml | 350/11 | 300/11 | 420/11 | 305/11 | 450/11 | 345/11 | 440/11 | 520/11 | — | — | — | — |
| ATP min 0 | 380/9 | 350/9 | 390/9 | 320/9 | 450/9 | 370/9 | 440/9 | 515/9 | | | | |
| 0,2 ml " 1 | 347 " | 300 " | 368 " | 298 " | 445 " | 344 " | 425 " | 260/10 | | | | |
| " 2 | 332 " | 284 " | 344 " | 274 " | 436 " | 335 " | 417 " | 253 " | | | | |
| " 3 | 316 " | 267 " | 320 " | 253 " | 427 " | 326 " | 161/10 | 246 " | | | | |
| " 4 | 301 " | 253 " | 296 " | 231 " | 419 " | 317 " | 155 " | 240 " | | | | |
| " 5 | 286 " | 237 " | 274 " | 211 " | 163/10 | 309 " | 148 " | 234 " | | | | |
| " 6 | 273 " | 223 " | 253 " | 192 " | 154 " | 301 " | 141 " | 227 " | | | | |
| " 7 | 260 " | 208 " | 233 " | 173 " | 146 " | 294 " | 134 " | 221 " | | | | |
| " 8 | 246 " | 195 " | 213 " | 155 " | 139 " | 285 " | 127 " | 215 " | | | | |
| " 9 | 234 " | 182 " | 194 " | 137 " | 132 " | 277 " | 120 " | 210 " | | | | |
| " 10 | 220 " | 169 " | 176 " | 120 " | 124 " | 269 " | 114 " | 205 " | | | | |
| " 11 | 208 " | 156 " | 160 " | 104 " | 116 " | 262 " | 107 " | 200 " | | | | |
| " 12 | 196 " | 144 " | 143 " | 87 " | 107 " | 254 " | 101 " | 194 " | | | | |
| " 13 | 184 " | 132 " | 127 " | 72 " | 100 " | 246 " | 94 " | 189 " | | | | |
| " 14 | 173 " | 120 " | 111 " | 57 " | 93 " | 238 " | 88 " | 183 " | | | | |
| " 15 | 162 " | 108 " | 96 " | 43 " | 85 " | 231 " | 82 " | 176 " | | | | |
| Trichloressigs. | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Überstand | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Molybdat+$H_2O$ | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 | 9,5 |
| Reduktion | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Acetatlsg.+$H_2O$ | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Extinktion | 232/6 | 234/6 | 225/6 | 224/6 | 196/6 | 188/6 | 171/6 | 163/6 | 224/6 | 230/6 | 18/6 | 16/6 |
| Mittelwert | 233/6 | | 224,5/6 | | 192/6 | | 167/6 | | 227/6 | | 17/6 | |

Versuch 12 Fortsetzung.

Die Ergebnisse von Phosphatbestimmungen und optischem Test sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Auswertung optischer Test:

Wegen der Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zeit sind die Aktivitäten für die Intervalle 2 - 10 min nach Start und 10 - 15 min nach Start gesondert angegeben.

Ergebnistabelle:

| | Glas Nr. | 2-10 min | 10-15 min | Einheit |
|---|---|---|---|---|
| Kontrolle 1 | 7 + 8 | $5,11 \pm 0,11$ | $2,77 \pm 1,53$ | mU/mg Tr. |
| Glycerinaldehyd 5 mM | 15 + 16 | $1,96 \pm 0,06$ | $1,9 \pm 0$ | mU/mg Tr. |
| Glycerinaldehyd 1 mM | 11 + 12 | $3,75 \pm 0$ | $3,37 \pm 0,07$ | mU/mg Tr. |
| Kontrolle 2 | 9 + 10 | $4,82 \pm 0,08$ | $3,8 \pm 0,15$ | mU/mg Tr. |
| Glycerinaldehyd 5 mM | 17 + 18 | $1,85 \pm 0,05$ | $1,79 \pm 0,03$ | mU/mg Tr. |
| Glycerinaldehyd 1 mM | 13 + 14 | $4,65 \pm 0,29$ | $3,57 \pm 0,07$ | mU/mg Tr. |

Die Tabelle macht deutlich, daß "ATP-ase"-Aktivitäten vorhanden waren. In den Proben mit 1 mM Glycerinaldehyd (Gläser Nr. 11 - 14) waren die Aktivitäten gegenüber den Kontrollen (Gläser Nr. 7 - 10) leicht vermindert. In den Gläsern Nr. 15 - 18, denen während des WARBURG-Versuches Glycerinaldehyd zu der Endkonzentration 5 mM zugegeben worden war, waren die Aktivitäten zwar nicht annähernd null wie bei den Versuchen von LITSCH (10), sie waren jedoch sehr stark vermindert.

Auswertung Phosphatbestimmung:

Von den Gläsern Nr. 1 - 6, die nicht mit ATP inkubiert worden waren, sonst aber völlig gleiche Zusammensetzung wie die analogen Gläser Nr. 7 - 18 hatten, enthielten nur die Gläser

Nr. 1, 4 und 6 ganz leicht erniedrigte Phosphatwerte, verglichen mit den inkubierten Proben. In den anderen Fällen waren die Phosphatgehalte nach der Inkubation mit ATP sogar niedriger, beziehungsweise innerhalb der Fehlergrenze der Messungen untereinander sogar gleich.

Trotz optisch gemessener "ATP-ase"-Aktivität konnte also durch die Phosphatbestimmung keine ATP-ase-Aktivität bestätigt werden. Um abzuschätzen, welche Extinktionsdifferenzen zwischen inkubierten und nicht inkubierten Proben nach dem NADH-Verbrauch zu erwarten sind, wurde folgende Rechnung durchgeführt:

Die gesamte Extinktionsänderung bei der Inkubation der Gläser Nr. 7 + 8 mit ATP war 0,258 und 0,278, im Mittel 0,268.

Das entspricht einem Umsatz von $\frac{0{,}268 \cdot 2}{6 \cdot 0{,}2}$ ca. 0,45 µMol/ml = 0,9 µMol/2 ml.

0,84 ml Standardlösung mit 1,5 µMol Phosphat pro ml enthalten 1,26 µMol Phosphat.

1,26 µMol Phosphat /2 ml....E = 0,217 (mit Leerwert korrigiert).

1 µMol Phosphat /2 ml....E = $\frac{0{,}217}{1{,}26}$

0,9 µMol Phosphat /2 ml....E = $\frac{0{,}217 \cdot 0{,}9}{1{,}26}$

Bei der optisch bestimmten Aktivität der Gläser Nr. 7 + 8 müßte also der Phosphatgehalt gegenüber der Kontrolle 1 so erhöht sein, daß eine Extinktionsdifferenz von 0,16 resultiert. Dies ist nicht der Fall.

## 3. Diskussion der Ergebnisse:

Die Besprechung der Ergebnisse betrifft allgemein folgende Fragen:

a. Die Sicherung der einzelnen Befunde.

b. Die Beurteilung anderer Laborbefunde aus dem Erkenntnisstand der vorliegenden Arbeit.

c. Die praktischen Konsequenzen für weiteres experimentelles Vorgehen.

Diese Fragen sollen für die einzelnen untersuchten Enzyme gesondert erörtert werden.

### 3.1. Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase.

Bei allen Messungen wurden keine oder äußerst geringe Aktivitäten gemessen. Die Frage, ob lediglich nach einer falschen Methode gearbeitet wurde, oder ob tatsächlich keine Aktivitäten vorhanden waren, ist durch den Testversuch eindeutig geklärt:
Wenn in zwei Erythrozytenhämolysaten beträchtliche Aktivitäten gefunden wurden und darüber hinaus im Hämolysat eines gesunden Kindes etwa doppelt so hohe Aktivität wie im Hämolysat eines heterozygoten Galaktosämie-Trägers bestimmt wurde, dann bedeutet dies, daß der Test funktionierte.
Diese etwas umständliche Beweisführung war deshalb nötig, weil reine GAL-1-PUT im Handel nicht zur Verfügung steht. Weitere Versuche sollten bei den in der Einleitung (Seite 4) erwähnten Experimenten nicht gemacht werden. Eine prak-

tische Konsequenz der Versuche, GAL-1-PUT in Extrakten aus Hirngewebe zu bestimmen, ist es, daß GAL-1-PUT unter keiner denkbaren pathologischen Bedingung im Liquor nachweisbar sein kann. Erschöpfendere "Extraktion" von Hirngewebe als in den hier beschriebenen Versuchen ist in vivo nicht möglich.

3.2. Adenosin-5'-Monophosphat-Nucleotidase.

Es wurden keine bemerkenswerten Aktivitäten dieses Enzyms nachgewiesen. Eine Überprüfung des Tests mit reinem Enzym ist nicht möglich, weil dieses nicht im Handel erhältlich ist. Andererseits ist die angewandte Analysenmethode völlig risikofrei, weil sie keine Hilfsenzyme oder andere biochemische Substanzen benötigt. Statt dessen wird lediglich nach einer sehr einfachen Reaktion anorganisches Phosphat als Abbauprodukt des AMPs bestimmt.
Da Abbaureaktionen ohnehin viel leichter ablaufen können als Synthesereaktionen (nicht-enzymatische chemische Zersetzung), kann mit Sicherheit behauptet werden, daß AMP nicht durch Dephosphorylierungen in Gegenwart von Hirnschnitten zersetzt wird. Wenn trotzdem nach Zugabe von cyclischem AMP (= Adenosin-3', 5'-monophosphat) zu Hirnschnitten eine rasche Hydrolyse zu AMP und ein weiterer sehr rascher Schwund des gebildeten AMPs aus den Lösungen stattfindet (Dissertation E. WILMES)(17), so muß der Abbau des AMPs nach einem anderen Mechanismus verlaufen.
Diese Annahme steht in völligem Einklang mit experimentellen Ergebnissen von H.KLUGE + V. WIECZOREK (9), die nachgewiesen haben, daß AMP im Hirngewebe in wesentlich stärkerem Maße durch

hydrolytische Abspaltung einer Aminogruppe als durch Abspaltung eines Phosphatrestes abgebaut wird.
Wenn also in späteren Versuchen in den beschriebenen Präparationen von ungeschädigtem und ödematösem Kaninchenhirn der Abbau von AMP verfolgt werden soll, so wird man zweckmäßigerweise Ammoniak- oder Aminohydrolase-Bestimmungen durchführen. Aus den in der Einleitung erwähnten Gründen erscheint auch eine Bestimmung von AMP-5'-Nucleotidase in Liquorproben als eine mögliche diagnostische Hilfsmethode nicht sinnvoll.

3.3. Myokinase.

Eine Sicherung der Befunde geht aus den Ergebnissen selbst hervor:
Es wurden in allen untersuchten Proben beträchtliche Aktivitäten von Myokinase gefunden.
Durch die von mir angewandte Versuchsanordnung wurde auch völlig ausgeschlossen, daß Aktivitäten anderer Enzyme mitgemessen wurden und damit zu hohe Myokinase-Aktivitäten vortäuschten. Nach Ablauf der Hydrierung von Pyruvat in den Proben wurde zunächst nur eine Lösung von ATP + PEP zugegeben. Es wurde völliger Extinktionsstillstand abgewartet, ehe durch Zugabe von AMP die Myokinase, sprich Reaktion, gestartet wurde. Damit ist sichergestellt, daß keine Phosphatase-Aktivität als Artefakt gemessen wurde.
Die Höhe der gefundenen Aktivitäten scheint in einer bestimmten Beziehung zu unterschiedlichen Versuchsanordnungen zu stehen:
Im Versuch A 14 wurde kein Unterschied der Myokinase-Aktivitä-

ten von ungeschädigtem und ödematösem Gehirn gefunden.
In Versuch F 7, wurde dagegen eine wesentlich höhere Myokinase--Aktivität in den Lösungen von ödematösen Schnitten gemessen. In diesem Versuch enthielten alle Proben 0,05 mM 2.4-Dinitrophenol. Möglicherweise hat dieser Entkoppler auf die Freisetzung der Myokinase aus den Schnitten oder auf die Myokinase--Aktivität selbst bei den ungeschädigten Schnitten einen hemmenden Einfluß verglichen mit den ödematösen Schnitten ausgeübt.
Ein anderer interessanter Effekt der Myokinase ergab sich bei den Versuchen Kl IV und A 14. In beiden Versuchen war die Myokinase-Aktivität in Lösungen mit Zusatz von Fructosediphosphat deutlich gegenüber den Kontrollen verringert.
Fructosediphosphat ist eine der Substanzen, die die Wassereinlagerung in die Schnitte bei in vitro-Inkubationen verringern (DITTMANN)(4,5,6). Es ist ferner auffällig, daß das Kalziumsalz des Fructosediphosphates den Wassergehalt der Schnitte und auch die Myokinase-Aktivität stärker verringert als das Natriumsalz.
Aus dem Versuch He II, in dessen Verlauf verschiedene Proben über sehr verschiedene Zeiten inkubiert wurden, geht hervor, daß von Anfang an Myokinase-Aktivitäten nachweisbar waren; Die Aktivitäten nahmen jedoch im Verlauf weiterer Inkubationen nicht zu. Daraus geht hervor, daß Myokinase nicht wie Lactat-Dehydrogenase oder Malat-Dehydrogenase als ein Maß für die Zellschädigung bei in vitro-Inkubation (Dissertation SCHÖNBERGER)(12) dienen kann. Eine Bestimmung von Myokinase--Aktivitäten erscheint nach meinen Versuchsergebnissen in

Liquorproben durchaus sinnvoll zu sein. Außerdem kann man in weiteren Versuchsserien prüfen, ob allgemein ein Zusammenhang zwischen der Hemmung der Schwellung von Hirnschnitten unter dem Einfluß zugesetzter Substanzen und der Erniedrigung von Myokinase-Aktivität in den Lösungen besteht.

3.4. Adenosintriphosphat spaltendes Enzym.

Bei allen optischen Messungen wurden beträchtliche Aktivitäten von "ATP-ase" gefunden. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen stehen die Ergebnisse der Phosphatbestimmungen.
Bei allen durchgeführten Versuchen wurden niemals Phosphaterhöhungen gefunden, die größenordnungsmäßig den NADH-Verbrauch bei einer ATP-ase-Reaktion erklären können.
Außerdem nahm die Phosphatkonzentration im allgemeinen mit zunehmender Inkubationszeit ab. Aus diesen Beobachtungen muß gefolgert werden, daß die untersuchten Proben zwar eine Spaltung des ATPs verursachten, jedoch keine ATP-ase-Aktivität hatten.
Kann man nun diesen unklaren Befunden gesicherte Aussagen gegenüberstellen?
Der Versuch 9 zeigte folgendes klares Ergebnis:
Wenn man die Inkubationslösungen in Puffer mit ATP reagieren läßt, so bildet sich ADP; es tritt jedoch nicht die äquivalente Menge anorganisches Phosphat auf.
Ich sehe für diese Beobachtung zwei Erklärungsmöglichkeiten:
Entweder enthalten die verwendeten ATP-Präparate (E. MERCK, Darmstadt und BOEHRINGER, Mannheim) AMP als Verunreinigung (die Folge wäre, daß ich Myokinase-Aktivitätan nach der

Reaktion ATP + AMP $\xrightarrow{MK}$ 2 ADP gemessen habe), oder ATP hat ein bisher unbekanntes Substrat nach der rein formalen Reaktionsgleichung ATP + X $\xrightarrow{?}$ ADP + X-P phosphoryliert.
Die zuletzt angedeutete Möglichkeit bereitet einer experimentellen Nachprüfung erhebliche Schwierigkeiten. Praktischer wird es sein, in einer anderen Versuchsserie vor und nach den Inkubationen AMP und anorganisches Phosphat zu bestimmen und diese Ergebnisse rechnerisch in Beziehung zu dem während der Reaktion gemessenen NADH-Verbrauch zu setzen. Erst wenn die Frage einer Myokinase-Reaktion trotz nicht extra zugesetztem AMP geklärt ist, und ausgeschlossen werden kann, lohnt sich die Suche nach einem anderen Substrat X, das von ATP enzymatisch phosphoryliert werden kann.
Abschließend sollte noch erwähnt werden, daß in den Proben, die während der WARBURG-Versuche Glycerinaldehyd zugesetzt erhielten, in Bestätigung früherer Beobachtungen wiederum deutlich herabgesetzte Aktivitäten der ATP-Spaltung gefunden wurden. Es war bereits früher nachgewiesen worden, daß ein Zusatz von Glycerinaldehyd zum Bestimmungsansatz selbst die Reaktion in der Küvette nicht beeinflußt.
Hier ist also der interessante Fall eingetreten, daß eine Substanz - Glycerinaldehyd -, die die Glykolyse der Hirnschnitte stark hemmt und die Wassereinlagerung in die Schnitte während der Inkubation verstärkt, eine Freisetzung des ATP umsetzenden Enzyms aus den Schnitten in die Lösung hinein deutlich vermindert. Die Frage des Zusammenhanges zwischen Beeinflussung der Wasseraufnahme der Schnitte in vitro und der Freisetzung des ATP spaltenden Enzyms aus den Schnitten

durch bestimmte Substanzen sollte deshalb in späteren Versuchen jedenfalls systematisch untersucht werden.

4. Zusammenfassung.

In den beschriebenen Versuchen wurden der Reihe nach Lösungen, die im WARBURG-Versuch mit Kaninchenhirnschnitten inkubiert worden waren, nach Galaktose-1-Phosphat--Uridyl-Transferase-, AMP-5'-Nucleotidase-, Myokinase-, und ATP-spaltendem Enzym-Aktivitäten untersucht.
GAL-1-PUT, Myokinase und zum Teil auch ATP-spaltendes Enzym wurden photometrisch nach ihrer NADH-Umsetzung untersucht. Das heißt, es wurde nach einer analytischen Methode gearbeitet, die es erlaubt, NADH-Bildung- oder -Verbrauch mittels Extinktionsänderung im UV-Bereich photometrisch zu verfolgen.
AMP-5'-Nucleotidase und ATP-spaltendes Enzym wurden nach einer Methode von GERLACH und HIBY (7) untersucht; hierbei wird anorganisches Phosphat mit Ammoniummolybdat in saurer Lösung zu Phosphomolybdensäure umgesetzt und in acetatgepufferter Lösung mit p-Aminophenol zu Molybdenblau reduziert. Photometrisch kann man nun in Abhängigkeit zur Bildung von Molybdenblau die Menge des gebildeten anorganischen Phosphates bestimmen.
Während ich bei den verwendeten Proben keine bzw. sehr geringe Aktivitäten von GAL-1-PUT und keine Aktivitäten von AMP-5'-Nucleotidase nachweisen konnte, fand ich in den Proben beträchtliche Myokinase-Aktivitäten und Aktivitäten eines "ATP-spaltenden Enzyms"; "ATP-spaltendes Enzym"

konnte durch optische Messungen gefunden werden, jedoch fanden sich bei der danach durchgeführten Phosphatbestimmung keine äquivalenten Mengen an anorganischem Phosphat. Womit diese Tatsache zusammenhängt, konnte ich nicht klären. Möglicherweise enthalten die ATP-Präparate der Firmen E. MERCK, Darmstadt und BOEHRINGER, Mannheim AMP-Verunreinigungen, oder bei der Reaktion tritt ein bislang unbekanntes Substrat X auf, das durch das entstandene anorganische Phosphat phosphoryliert wird.

## 5. Schrifttumsverzeichnis.


( 1) AEBI, H.: Helv. physiol. Acta 10 (1952): 184

( 2) BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Aufl. Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße (1970): 145 - 168

( 3) BOEHRINGER, GmbH Mannheim: Biochemica Katalog: MK: Ausgabe Jan. 1968 GAL-1-PUT: Ausgabe Sept. 1968

( 4) DITTMANN, J.: Untersuchungen zum Glucosestoffwechsel von normalen und ödematösen Kaninchen-Hirnschnitten (1973 in Vorbereitung)

( 5) DITTMANN, J. and HERRMANN, H.-D.: Examinations of the Metabolism of Oedematous Brain Tissue. III. The Influence of the Oxygen Concentration on the Respiration and the Aerobic Glycolysis of Normal and Oedematous Rabbit Brain in Vitro. Acta Neurochir., (1973, in press).

( 6) DITTMANN ,J., HERRMANN, H.-D. and OBERMANN, U.: Examinations of the Metabolism of Oedematous Brain Tissue. II. The Influence of the Glucose

Concentration on the Respiration and the Aerobic Glycolysis of Normal and Oedematous Rabbit Brain in Vitro.
Acta Neurochir., (1972, in press).

( 7) GERLACH, U. und HIBY, W.: in: Methoden der enzymatischen Analyse. Ed: BERGMEYER, H.U. Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße 2. Aufl. (1970) 833 - 837

( 8) HERRMANN, H.-D. and DITTMANN, J.: Examination of the Metabolism of Oedematous Brain Tissue. I. Alterations of the Metabolism in the Coldoedema of the Rabbit-brain Measured Manometrically in Vitro. Acta Neurochir., 22, (1970): 167 - 175

( 9) KLUGE, H. und WIECZOREK, V.: Zur Regulation der zytoplasmatischen AMP-Aminohydrolase des Rattenhirns.
Acta biol. med. germ. 22, (1969): 205 - 207

(10) LITSCH, J.Th.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar (1973)

(11) QUASTEL, J.H.: in: Metabolism of the nervous System.

Ed: D. RICHTER, Pergamon Press London, New York, Paris, Los Angeles. (1957): 267 - 285

(12) SCHÖNBERGER, P.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar (1972)

(13) SIGMA: Chemical Company Price List, St. Louis, Mo USA (may 1972): 358

(14) TRAUTMANN, D.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar (1971)

(15) WARBURG, O.: Wasserstoff übertragende Fermente Berlin: Saenger 1948

(16) WARBURG, O.: Neue manometrische Zwei-Gefäß--Methode.Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. , 348, (1967): 1677 - 1682

(17) WILMES, E.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar (1973)

Nach Fertigstellen meiner Arbeit wurde ich auf eine Veröffentlichung von Jens Gr. NØRBY aufmerksam, der sich in seiner Abhandlung mit ATP-ase-Reaktionen befaßt.

(18) NØRBY, J.G.: Studies on a Couled Enzyme Assay for Rate Measurements of ATP-ase-Reactions. Acta Chem. Scand. 25 (1971) 2717 - 2726

## 6. Verzeichnis der Abkürzungen.

| | |
|---|---|
| ADP | = Adenosindiphosphat |
| AMP | = Adenosinmonophosphat |
| A-3',5'-MP | = Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| ATP | = Adenosintriphosphat |
| ATP-ase | = Adenosintriphosphat spaltendes Enzym |
| CHA-Salz | = Cyclohexyl-ammonium-Salz |
| DNP | = 2,4-Dinitrophenol |
| F-1,6-$P_2$ | = Fruktosephosphat |
| GAL-1-PUT | = Galaktosephosphat-Uridyltransferase |
| G-1,6-$P_2$ | = Glucosediphosphat |
| G-1-P | = Glucosephosphat |
| G-6-P | = Glucosephosphat |
| G-6-PDH | = Glucosephosphat-Dehydrogenase |
| LDH | = Lactat-Dehydrogenase |
| MK | = Myokinase |
| Mg-K-Lsg | = Magnesium-Kalium-Lösung |
| NAD | = Nicotin-Adenin-Dinucleotid |
| NADH | = Nicotin-Adenin-Dinucleotid; reduziert |
| NADP | = Nicotin-Adenin-Dinucleotidphosphat |
| NADPH | = Nicotin-Adenin-Dinucleotidphosphat; reduziert |
| $P_i$ | = anorganisches Phosphat |
| $P_2$ | = Diphosphat |

PEP = Phosphoenolpyruvat

PGluM = Phosphoglucose-Mutase

PK = Pyruvatkinase

Tr.=Trs. = Trockensubstanz

TRA = Triäthanolamin-Hydrochlorid

UDPG = Uridyl-Diphosphat-Glucose

Lebenslauf:

Am 26. Februar 1946 wurde ich als Sohn des Tierarztes Dr. Günther Gebicke und seiner Ehefrau Marianne Gebicke in Neustadt a.d.W. geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich das Neusprachliche Gymnasium in Bad Dürkheim und machte im Frühjahr 1966 das Abitur.

Nach bestandener Reifeprüfung im Frühjahr 1966 schrieb ich mich in der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Saarbrücken ein.

Im Februar 1968 bestand ich das Vorphysikum in Saarbrücken und im Juli 1970 das Physikum in Homburg/Saar.

Herrn Professor Dr. med. F. LOEW, Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes in Homburg, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas zu der vorliegenden Arbeit.

Ganz besonderen Dank sage ich auch Herrn Dr. rer. nat. J. DITTMANN, Neurochirurgische Universitätsklinik, Homburg; seine jederzeit bereitwillige Hilfe und seine wertvollen Ratschläge trugen sehr zum praktischen Gelingen meiner Versuche und zur Ausarbeitung und Abfassung meiner Arbeit bei.